ReproCardio 2^{TM}

Cat. RCESD009

Version 1.0

Manuals

ReproCardio2™　解凍播種

実験操作の重要ポイント

- 凍結細胞バイアルは生存率を高く保つために、液体窒素中で保管してください。
- 解凍前にクリーンベンチ内でバイアルのキャップを 4 分の 1 ほどまわし、バイアル内の気化した窒素を抜きます。（完全には開けないで下さい。）
- 細胞の解凍から培地への移行は 5 分以内、さらに播種までは 45 分以内に行なってください。操作に時間がかかると、生存率が著しく低下します。
- 初めて本製品を使用される場合、細胞の解凍から培地への移行（ステップ 2.1-2.9）については、事前に練習用バイアル（細胞なし）を用いて、練習を行ってください。
- ピペッティングにより細胞がダメージを受けますので、バイアルからピペットで細胞懸濁液を吸うときに、3 秒数えるようにゆっくりと吸うように注意して下さい。
- 細胞の解凍は必ず 1 バイアルずつ行なってください。

準備	解凍	遠心	洗浄	遠心	カウント	播種
	5 分以内					
	45 分以内					

製品内容

①	凍結細胞バイアル（1.0×10^5 cells）×1
②	練習用バイアル（細胞なし）×1
③	ReproCardio Culture Medium 2™ (FBS-) (80 mL x 1)
④	ReproCoat™ (30 mL ×1)
⑤	U 底 96-well plate ×1
⑥	平底 96-well plate ×1

保存条件：①液体窒素、②③−20℃、④～⑥室温

注 1） ReproCarido Culture Medium 2™へは、使用前に FBS と抗生物質を添加してお使いください。

注 2） 凍結細胞バイアルは到着後にすみやかに液体窒素に移してください。

別途ご準備いただく試薬

- Fetal Bovine Serum [FBS; Life Technologies. (Gibco), Cat. 10437-028]
- Penicillin Streptomycin [Life Technologies. (Gibco), Cat. 15140]

1.　培地の調製

1.1.　ReproCardio Culture Medium 2™（FBS-）を冷蔵庫 4℃に移して、一晩解凍して下さい。

1.2.　20 mL の FBS および 1 mL の Penicillin-Streptomycin を 80 mL の ReproCardio Culture Medium 2™（FBS-）のボトルに入れて下さい。

1.3.　調製済みの培地類は 10 mL ずつに分注して、口元をパラフィルム等で覆ってから 4℃で保管し、3 週間以内にご使用ください。繰り返し温めた培地は、成分劣化により細胞に悪影響を与えます。再凍結は行わないでください。

2.　細胞の解凍

注 3） 初めて本製品を使用される場合は練習用バイアルを用いて解凍操作（ステップ 2.1-2.9）の練習を行なってください。この場合は遠心チューブ A のみをご準備ください。チューブ B と C は不要です。

2.1.　調製後の培地を 10 mL ずつ 3 本の 15 mL 遠心チューブ（A, B, および C）に分注して、恒温槽（37℃）で 15 分以上温めて下さい。

2.2.　温められたチューブ A を安全キャビネットに運んで、すぐに操作ができるようにキャップを緩めて準備しておきます。

2.3.　液体窒素用のリザーバーに液体窒素を入れ凍結細胞バイアルを運ぶ準備をします。

2.4.　凍結細胞バイアル 1 本（以下、バイアル）を液体窒素から取り出し、リザーバーにいれ安全キャビネットへ持っていきます。

2.5.　バイアルをリザーバーから取り出し、安全キャビネット内でバイアルの蓋を 1/4 程ひねり内部の液体窒素を抜き、再び蓋を閉めてください。

注 4） このプロセスはバイアルの温度上昇を防ぐため 30 秒以内に行うようにしてください。

注 5） 蓋はコンタミネーションを防ぐため、完全に開けないようにしてください。

2.6.　リザーバーを恒温槽の近くに持っていきます。

2.7.　バイアルをリザーバーから取り出し、直ちに恒温槽にいれます。バイア

ルを円を描くようにゆすりながら 90 秒間加温し、その後、恒温槽から取り出し、急いで安全キャビネットに移します。

注 6) この過程は 90 秒以内で終えるようにしてください。バイアルの中身を完全に溶解させてしまうと細胞の生存率が減少します。

2.8. バイアルを安全キャビネット内に移動させ、付着した水滴をふき取った後に、バイアル内の細胞全量を、デカンタでチューブ A に素早く移します。

注 7) 解凍開始からここまでを、必ず 2 分以内に行なってください（恒温槽 90 秒＋移し替え 30 秒以内）。

2.9. さらに、バイアルに付着した細胞を回収するために、チューブ A の培地 1 mL を空のバイアルに加えて、バイアルを洗い、チューブ A に戻します。

2.10. 室温、300 ×*g* から 350 ×*g* の範囲内で 5 分で遠心して下さい。

2.11. 遠心している間にチューブ B を恒温槽から安全キャビネットに移します。

2.12. 遠心後のチューブ A を、細胞ペレットが再懸濁しないように慎重に安全キャビネットまで運んで下さい。

2.13. 細胞ペレットを吸わないように注意しながら上清を吸って下さい。細胞ペレットは見えにくいので、アスピレーターの先端は細胞から離すようにしてください。

2.14. 遠心チューブ B 内の培地（10 mL）をチューブ A へ入れて下さい。 この時、ピペッティングはしないで下さい。

2.15. 室温、300 ×*g* から 350 ×*g* 、5 分で遠心して下さい。

2.16. 細胞ペレットを吸わないように注意しながら 9 mL の上清を吸って 1 mL 残します。

2.17. P-1000 ピペットを 1 mL に設定して、6 回ピペッティングすることにより、細胞を懸濁させます。ピペッティングが強かったり、泡を立てると細胞に対してダメージとなりますので、ピペッティングは 6 秒数えながらゆっくり泡を立てないように行なって下さい。この時の細胞は 1.0×10^5 cells (1 mL) となります。

3. 細胞播種

注８） チューブ C の培地は、細胞播種時に希釈用で使用してください。

注 9) 細胞の解凍から播種までは長くとも 45 分以内に行ってください。

細胞の播種に関しては、以下の取扱説明書をご覧ください。

- 薄層心筋の細胞外電位測定(αMED･･page 4)、（MCS･･page 7)（Axion･･page 10）
- カルシウムイメージング･･page 13
- パッチクランプ用の培養方法･･page 16
- 免疫染色･･page 18

よくある質問

Q1. FBS のメーカーについては指定がありますか？

A1.特にございません。

Q2. 解凍時間が 90 秒より短いとどうなりますか？

A2. バイアルの内容物が十分に溶解していないため、チューブ A に移すことが困難となります。

Q3. 逆に解凍時間が 90 秒より長いとどうなりますか？

A3. 生存率、再形成率および生着率が低下し、その後、細胞が生育しません。

Q4. 解凍した細胞を 1 回目の遠心操作まで 5 分以内で行うにはどうすればいいですか？

A4. 練習用バイアルを使って練習をお願いします。また、操作 2.1.から 2.9.までの準備が整っていることを確認した後にバイアルの解凍を行ってください。もし可能であればできる限り恒温槽から近い位置での解凍播種操作を心がけてください。

Q5. 解凍した細胞がシングルに分散しているか、どうやって確認すればいいですか？

A5. 目視で凝集体が浮遊していなければ結構です。

Q6. シングルセルに分散する場合にピペッティングを繰り返して行ってよいですか？

A6. マイクロピペット（p-1000）で 10 回のピペッティングを限度としてください。

Q7. 播種前に細胞を懸濁しても小さな塊が残りますが、どうすればいいですか？

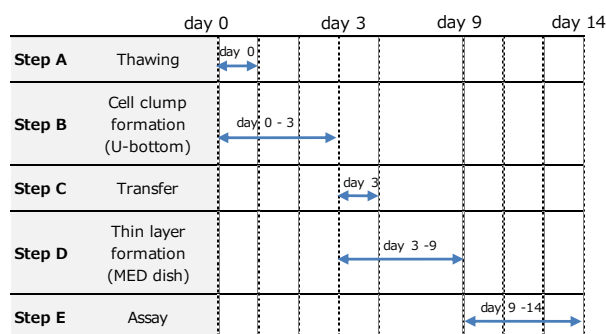
A7. ピペッティングをしても塊が残った場合は、そのまま播種してください。U 字底 96 well plate で塊を形成させるのであれば、再拍動には問題ありません。

ReproCardio2™：薄層心筋の細胞外電位測定

MED64 SYSTEM (ALPHA MED SCIENTIFIC, αMED)

実験操作の重要ポイント

1. １つの心筋塊の作成には 15,000 細胞数をご使用ください。心筋塊が小さいと薄層化する可能性が低くなります。
2. ほぼ全ての well で心筋塊が形成される day 3 で MED dish に移してください。
3. day 3 を過ぎた場合、細胞塊の内部接着が強くなり、移し替えた後に薄層型にならず、塊のままになる可能性が高くなります。
4. day 3 の心筋塊は細胞間結合が弱いので、MED dish へ移す際に、心筋塊を吸うときにゆっくりとピペット操作をして下さい。
5. day 5 以降の培地交換は 1 日おきに 1,000 μL の培地を使用して下さい。 培地交換時に細胞が剥がれやすいので、アスピレーターを使用せず、ピペットを用いてゆっくりと入れ替えをして下さい。
6. アッセイの時には、37℃、5% CO_2 の環境下で行ってください。 CO_2 を調節することは拍動周期の一定化につながります。
7. 電極サイズは、20 μm×20 μm をお奨め致します。

実験スケジュール（MED dish 上での薄層心筋の形成）

		day 0 – day 3 – day 9 – day 14
Step A	Thawing	day 0
Step B	Cell clump formation (U-bottom)	day 0 - 3
Step C	Transfer	day 3
Step D	Thin layer formation (MED dish)	day 3 -9
Step E	Assay	day 9 -14

製品に含まれない必要試薬（別売）

名称	Catalog number	注意事項
ReproCardio Assay Medium ™	ReproCELL, RCESD007	4°C 保管
Fibronectin Human, Plasma	Life Technologies, 33016-015	4°C 保管
5% CO_2／Air 混合ガス	–	室温保管

注 1) 解凍播種のマニュアルをご参照下さい（page 2-3)。

Step A: 解凍と細胞懸濁液の準備（day 0)

1. RCESD009 ： 1 つのバイアルの細胞懸濁液（1.0×10^5 cells/mL）へ、1.0 mL の培地(チューブ C)を入れてください（細胞濃度は 0.5×10^5 cell/mL となります）。

   注 2) 細胞懸濁液は使用前まで細胞懸濁液の温度を下げないように、恒温槽（37°C）で温めておいて下さい。温度が下がると、生存率が低下する可能性があります。

Step B: 心筋塊の形成（U-bottom 96-well Plate）(day 0-3)

1. 300 μL の細胞懸濁液を 付属の U-bottom 96-well plate へ播種して下さい。

   注 3) 薄層心筋を形成するためには、予め心筋塊の細胞数は 1.5×10^4 cells／300 μL であることをお奨め致します。
2. 播種した細胞は 37°C、5% CO_2 インキュベーターで培養をして下さい。翌日、培地を 100 μL 除去して下さい（培地量が 200 μL となります）。
3. day 2 では 100 μL の培地を除き、新しい培地を 100 μL 加えてください。
4. 細胞は day 1-3 で凝集塊を形成します。

   心筋塊の形成率の例：(day 1) 30-50%、(day 2) 80%、(day 3) 100%

Step C: 心筋塊の播種（MED dish）(day 3)

注 4) ほぼ全ての well で心筋塊が形成される day 3 に MED

dish へ移し替えてください。day 3 を過ぎた場合、細胞塊の内部接着が強くなるため細胞塊がくずれず、薄層化しない可能性が高くなります。

注 5) 心筋塊はプラスチック素材のプレート上では高確率で薄層化しますが（約 90%の確率）、ガラス素材のプレートでは確率が下がりますので（約 50%の確率）、複数個の MED dish へ心筋塊を播種して下さい。

1. φ100 mm dish へ MED dish（MED-P210A）をいれて下さい。
2. 5 mg Fibronectin Human, Plasma (Invitrogen, 330160-015) を 50 μg / mL になるように PBS（-）で希釈して下さい。
3. MED dish1 枚に **20 μL** の 50 μg / mL Fibronectin を電極上に入れて、蒸発を避けるために MED Dish の外側に PBS (-) を 3 mL 入れて、37°C、 5% CO_2 インキュベーター内で 1 時間以上置いて下さい。
4. PBS (-) を 1 mL 入れてから、MED dish 上のコーティング剤（Fibronectin 溶液）と共に取り除いて下さい。
5. P-200 ピペットを **150 μL** にセットして下さい。
6. ピペットを使用して、U-bottom plate の心筋塊および培地の全てを MED dish へ移し替えて下さい。

   注 6) 4 well dish を使用する場合は、心筋塊および培地を 75 μL にして移し替えてください。
7. チップ、ガラス棒を使用して心筋塊を電極上に載せてください。
8. 心筋塊を播種した MED dish は 37°C、5% CO_2 インキュベーターで培養して下さい。

Step D: 薄層心筋の形成（MED dish）(day 4-9)

1. day 4 で培地を 200 μL 添加してください。

   注 7) 4 well dish を使用する場合は、培地を 125 μL 添加してください。
2. 心筋塊は拍動し始めて、徐々にくずれながら電極上に拡がっていきます。

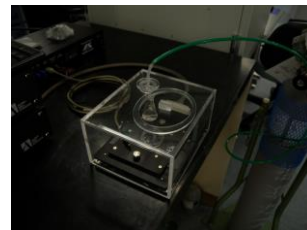
   注 8) 培養経過と共に心筋塊の輪郭が不明瞭になって、次頁の 2.代表的な薄層心筋画像（MED dish）のように層の状態になることが理想的な薄層心筋です。
3. 培地交換は 1 日おきに行って下さい。P-1000 ピペットを 1,000 μL に設定して、培地をゆっくりと全て取り除き、1,000 μL の培地をゆっくりと添加して下さい。

   注 9) 培地交換時に細胞が剥がれてしまうことがあるので、アスピレーターを使用せず、ピペットでゆっくりと行って下さい。

   注 10) 培地を添加する時に細胞の上に直接添加しないように、壁沿いにチップの先をあてながらゆっくりと添加して下さい。

   注 11) 4 well を使用する場合は、培地を 200 μL 添加してください。

Step E: 細胞外電位測定（day 9-14）

1. 試験試薬（×10）を用意し、37℃に加温して下さい。
2. 電極内の培地温度が 37℃となるように温度調節器を設定して下さい。蒸発を防ぐために MED dish の上に 35 mm dish の蓋で覆って下さい。更に密閉性を高めるために容器で覆って下さい。

   注 12) 電極内の細胞周辺部が常時 **37°C** となるように適切な温度になっているか必ず確認しながら温度調節器を調節して下さい。
3. MilliQ 水 10 mL をビーカーに入れて、5% CO_2／Air 混合ガスのチューブを入れて、バブリングしてガスを送り込んで下さい。
4. MED dish 内の培地を P-1000 ピペットで全て取り除いて下さい。温められた ReproCardio Assay Medium ™を 1,000 μL 添加して下さい。インキュベーター内で 10 分置いてください。

   注 13) 4 well を使用する場合は、ReproCardio Assay Medium ™を 200 μL/well 添加してください。
5. 実際の測定環境下が拍動を安定化するために MED dish を測定器にセットして 10 分間測定静置して下さい。

   注 14) 培地交換時に細胞が剥がれてしまうことがあるので、アスピレーターを使用せず、ピペットでゆっくりと行って下さい。

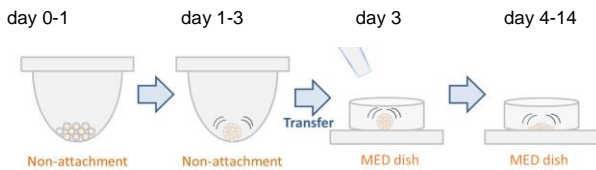
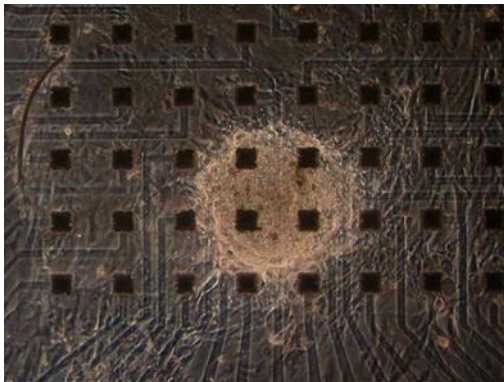
   注 15) 細胞外電位測定は day 9 から day 14 の間に行って下さい。day 9 以前では拍動が安定化しない可能性があり、一方 day 14 以降では細胞が剥がれてくる可能性が高くなります。
6. 細胞外電位を測定して、拍動心筋細胞の品質(拍動回数、拍動間隔)を確認してください。
7. 試薬の添加は、試験試薬（×10）の量分を抜いてから試験試薬を添加して下さい。
8. 細胞の刺激とならないように細胞周辺部をゆっくりとピペッティングして、試験試薬を混ぜて下さい。

9. 添加後 4 分あるいは 10 分間の細胞外電位の波形を記録して最後の 2 分間の波形を解析して下さい。

注 16) 用量依存性を確認する場合、7-9 の段階を繰り返して下さい。

注 17) 薬剤暴露時間については、薬剤に応じて、暴露時間を変えて行ってください。

心筋塊形成から薄層心筋へ再形成の概略図

1. 心筋塊形成の模式図

2. 代表的な薄層心筋画像（MED dish）

よくある質問

Q1. U 字プレート内の心筋塊が拍動しません。

A1. 通常 day 2-3 で拍動を開始しますが、day 4 以降になる場合も観察されておりますので培地交換と観察を継続して下さい。電極上に移す場合は拍動していなくても塊の状態になっていたら移して下さい。

Q2. 培地交換はどの程度した方が良いですか

A2.一日おきに行って下さい。培地は予め複数個に分注してご使用下さい。

Q3. MED に移しても薄層化しません。

A3. day 3 で移し替えても薄層化しないことは、約 50%の確率となっております(現在、開発中となっております)。現段階では複数個の MED dish へ心筋塊を播種することをお奨め致します。

Q4. 薄層心筋が MED から剥がれました。

A4. 培地交換時、長期間の培養（day 14 以上）で剥がれることがございますので、アッセイに使用する場合は day 9 から day 14 の間でご使用いただくようお願い致します。

Q5. 細胞外電位のデータが取得できません。

A5. 薄層心筋の拍動領域が電極上にあると、細胞外電位が取得できますが、電極から拍動領域が離れた場合には電位が取得できませんので、複数個の MED dish へ心筋塊を播種することをお奨め致します。

Q6. 細胞外電位のデータが安定化しません。

A6. 通常 day 10 以降で安定した拍動が観察されますが、もし安定した拍動が得られない場合は、培養期間の延長、試験環境下の温度調節にもご注意下さい。

Q7. 5% CO_2／Air 混合ガスがない場合はどうしたらよいですか。

A7. 5% CO_2／Air 混合ガスは安定した周期の拍動を外部環境でも可能とするために必要ですので購入をお薦め致します。

ReproCardio2™：薄層心筋の細胞外電位測定

MEA system (multi channel systems)

実験操作の重要ポイント

1. １つの心筋塊の作成には 15,000 細胞数をご使用ください。心筋塊が小さいと薄層化する可能性が低くなります。
2. ほぼ全ての well で心筋塊が形成される day 3 で MEA dish に移してください。
3. day 3 を過ぎた場合、細胞塊の内部接着が強くなり、移し替えた後に薄層型にならず、塊のままになる可能性が高くなります。
4. day 3 の心筋塊は細胞間結合が弱いので、MEA dish へ移す際に、心筋塊を吸うときにゆっくりとピペット操作をして下さい。
5. day5 以降の培地交換は 1 日おきに 1,000 µL の培地を使用して下さい。 培地交換時に細胞が剥がれやすいので、アスピレーターを使用せず、ピペットを用いてゆっくりと入れ替えをして下さい。
6. アッセイの時には、37℃、5% CO_2 の環境下で行ってください。CO_2 を調節することは拍動周期の一定化につながります。
7. 電極サイズは、30 µm×30 µm をお奨め致します。

実験スケジュール（MEA dish 上での薄層心筋の形成）

Step		Schedule (day 0 / day 3 / day 9 / day 14)
Step A	Thawing	day 0
Step B	Cell clump formation (U-bottom)	day 0 - 3
Step C	Transfer	day 3
Step D	Thin layer formation (MEA dish)	day 3 -9
Step E	Assay	day 9 -14

製品に含まれない必要試薬（別売）

名称	Catalog number	注意事項
ReproCardio Assay Medium ™	ReproCELL, RCESD007	4°C 保管
Fibronectin Human, Plasma	Life Technologies, 33016-015	4°C 保管
5% CO_2／Air 混合ガス	−	室温保管

注 1) 解凍播種のマニュアルをご参照下さい (page 2-4)。

Step A: 解凍と細胞懸濁液の準備 (day 0)

1．RCESD009 ： 1 つのバイアルの細胞懸濁液（1.0×10^5 cells/mL）へ、1.0 mL の培地を入れてください（細胞濃度は 0.5×10^5 cell/mL となります）。

注 2) 細胞懸濁液は使用前まで細胞懸濁液の温度を下げないように、恒温槽（37°C）で温めておいて下さい。温度が下がると、生存率が低下する可能性があります。

Step B: 心筋塊の形成（U-bottom 96-well Plate）(day 0-3)

1. 300 µL の細胞懸濁液を 付属の U-bottom 96-well plate へ播種して下さい。

   注 3) 薄層心筋を形成するためには、予め心筋塊の細胞数は 1.5×10^4 cells／300 µL であることをお奨め致します。

2. 播種した細胞は 37°C、5% CO_2 インキュベーターで培養をして下さい。翌日、100 µL の培地を除去してください（培地量が 200 µL となります）。
3. day 2 では 100 µL の培地を除き、新しい培地を 100 µL 加えてください。
4. 細胞は day 1-3 で凝集塊を形成します。

   心筋塊の形成率の例：(day 1) 30-50%、(day 2) 80%、(day 3) 100%

Step C: 心筋塊の播種（MEA dish）(day 3)

注 4) ほぼ全ての well で心筋塊が形成される day 3 に MEA dish へ移し替えてください。day 3 を過ぎた場合、細胞塊の内部接着が強くなるため細胞塊がくずれず、薄層化しない可能性が高くなります。

注 5) 心筋塊はプラスチック素材のプレート上では高確率で薄層化（約 90%の確率）しますが、ガラス素材のプレート （例 MEA dish 等）では確率が下がります（約 50%の確率）ので、複数個の MEA dish へ心筋塊を播種して下さい。

1. φ100 mm dish へ MEA dish(200/30)(MCS60MEA200/30iR-Ti-gr）をいれて下さい。
2. 5 mg Fibronectin Human, Plasma (Life Technologies, 330160-015) を 50 μg/mL になるように PBS (-)で希釈して下さい。
3. MEA dish 1 枚に **20 μL** の 50 μg/mL Fibronectin を電極上に入れて、蒸発を避けるために MEA dish の外側に PBS (-) を 3 mL 入れて、37°C、 5% CO_2 インキュベーター内で 1 時間以上置いて下さい。
4. PBS (-) を 1 mL 入れてから、MEA dish 上のコーティング剤（Fibronectin 溶液）と共に取り除いて下さい。
5. P-200 ピペットを **150 μL** にセットして下さい。
6. ピペットを使用して、ゆっくりと、U-bottom plate の心筋塊を MEA dish へ移し替えて下さい。

注 6) 6 well dish を使用する場合は、心筋塊および培地を 33 μL にして移し替えてください。

7. 培地が全体にわたるように、傾けてください。
8. チップ、ガラス棒を使用して心筋塊を電極上に載せて下さい。
9. 心筋塊を播種した MEA dish は 37℃、5% CO_2 インキュベーターで培養してください。

Step D: 薄層心筋の形成（MEA dish）(day 4-9)

1. day 4 で培地を 200 μL 添加してください。

注 7) 6 well dish を使用する場合は、培地を 100 μL/well 添加してください。

2. 心筋塊は拍動し始めて、徐々にくずれながら MEA dish 上に拡がっていきます。

注 8) 培養経過と共に心筋塊の輪郭が不明瞭になり、次頁の 2. 代表的な薄層心筋画像（MEA dish）のように層の状態になることが理想的な薄層心筋です。

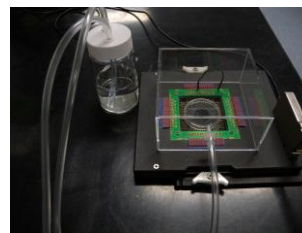
3. 培地交換は 1 日おきに行って下さい。P-1000 ピペットを 1,000 μL に設定して、MEA dish 内の培地をゆっくりと全て取り除き、1,000 μL の培地をゆっくりと添加して下さい。

注 9) 培地交換時に細胞が剥がれてしまうことがあるので、アスピレーターを使用せず、ピペットでゆっくりと行って下さい。

注 10) 培地を添加する時に細胞の上に直接添加しないように、MEA dish の壁沿いにチップの先をあてながらゆっくりと添加して下さい。

注 11) 6 well dish を使用する場合は、培地を 150 μL/well 添加してください。

Step E: 細胞外電位測定 (day 9-14)

1. 試験試薬（×10）を用意して下さい。
2. 電極内の培地温度が 37℃となるように温度調節器を設定して下さい。蒸発を防ぐために MEA dish の上 に 35 mm dish の蓋で覆って下さい。更に密閉性を高めるために容器で覆って下さい。

注 12) 電極内の細胞周辺部が常時 **37°C** となるように適切な温度になっているか必ず確認しながら温度調節器を調節して下さい。

3. MilliQ 水 30 mL をビーカーに入れて、5% CO_2／Air 混合ガスのチューブを入れて、バブリングしてガスを送り込んで下さい。
4. 電極内の培地を P-1000 ピペットで全て取り除いて下さい。 温められた ReproCardio Assay Medium ™ を 800 μL 添加して下さい。インキュベーター内で 10 分置いてください。

注 13) 6 well dish を使用する場合は、ReproCardio Assay Medium ™ を 150 μL/well 添加してください。

5. 実際の測定環境下が拍動を安定化するために MEA dish を測定器にセットして 10 分間測定静置して下さい。

注 14) 細胞外電位測定は day 9 から day 14 の間に行って下さい。day 9 以前では拍動が安定化しない可能性があり、一方 day 14 以降では細胞が剥がれてくる可能性が高くなります。

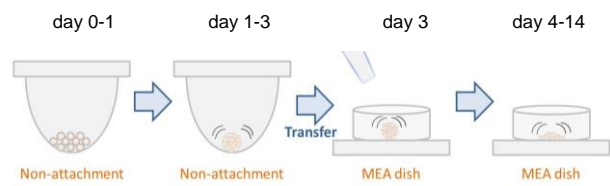
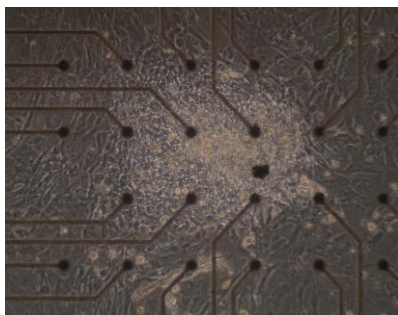
6. 細胞外電位を測定して、拍動心筋細胞の品質(拍動回数、拍動間隔)を確認してください。

7. 試薬の添加は、試験試薬（×10）の量分を抜いてから試験試薬を添加して下さい。
8. 細胞の刺激とならないように細胞周辺部を 1 回ゆっくりとピペッティングして、試験試薬を混ぜて下さい。
9. 添加後 4 分あるいは 10 分間の細胞外電位の波形を記録して最後の 2 分間の波形を解析して下さい。

注 15) 用量依存性を確認する場合、7-9 の段階を繰り返して下さい。

注 16) 薬剤暴露時間については、薬剤に応じて、暴露時間を変えて行ってください。4 分間については初期変化、10 分間について初期変化後の薬剤の作用も含めての検討を想定していますので、目的に応じてご使用下さい。

心筋塊形成から薄層心筋へ再形成の概略図

1．心筋塊形成の模式図

2　代表的な薄層心筋画像（MEA dish）

よくある質問

Q1. U 字プレート内の心筋塊が拍動しません。

A1. 通常 day 2-3 で拍動を開始しますが、day 4 以降になる場合も観察されておりますので培地交換と観察を継続して下さい。MEA に移す場合は拍動していなくても塊の状態になっていたら移して下さい。

Q2.培地交換はどの程度の頻度でした方が良いですか

A2.一日おきに行って下さい。培地は予め複数個に分注してご使用下さい。

Q3. MEA に移しても薄層化しません。

A3. day 3 で移し替えても薄層化しないことは、約 50%の確率となっております(現在、開発中となっております)。現段階では複数個の MEA dish へ心筋塊を播種することをお奨め致します。

Q4. 薄層心筋が MEA から剥がれました。

A4. 培地交換時、長期間の培養（day 14 以上）で剥がれることがございますので、アッセイに使用する場合は day 9-14 の間でご使用いただくようお願い致します。

Q5. 細胞外電位のデータが取得できません。

A5 薄層心筋の拍動領域が電極上にあると、細胞外電位が取得できますが、電極から拍動領域が離れた場合には電位が取得できませんので、複数個の MEA dish へ心筋塊を播種することをお奨め致します。

Q6. 細胞外電位のデータが安定化しません。

A6. 通常 day 10 以降で安定した拍動が観察されますが、もし安定した拍動が得られない場合は、培養期間の延長、試験環境下の温度調節にもご注意下さい。

Q7. 5% CO_2／Air 混合ガスがない場合はどうしたらよいですか。

A7. 5% CO_2／Air 混合ガスは安定した周期の拍動を外部環境でも可能とするために必要ですので購入をお薦め致します。

ReproCardio2™：薄層心筋の細胞外電位測定

Maestro (Axion)

実験操作の重要ポイント

1. １つの心筋塊の作成には 15,000 細胞数をご使用ください。心筋塊が小さいと薄層化する可能性が低くなります。
2. ほぼ全ての well で心筋塊が形成される day 3 で MEA probe に移してください。
3. day 3 を過ぎた場合、細胞塊の内部接着が強くなり、移し替えた後に薄層型にならず、塊のままになる可能性が高くなります。
4. day 3 の心筋塊は細胞間結合が弱いので、MEA probe へ移す際に、心筋塊を吸うときにゆっくりとピペット操作をして下さい。
5. day 5 以降の培地交換は 1 日おきに 1,000 µL の培地を使用して下さい。 培地交換時に細胞が剥がれやすいので、アスピレーターを使用せず、ピペットを用いてゆっくりと入れ替えをして下さい。
6. アッセイの時には、37℃、5% CO_2 の環境下で行ってください。 CO_2 を調節することは拍動周期の一定化につながります。

実験計画（MEA　probe 上での薄層心筋の形成）

		day 0 – day 3 – day 9 – day 14
Step A	Thawing	day 0
Step B	Cell clump formation (U-bottom)	day 0 - 3
Step C	Transfer	day 3
Step D	Thin layer formation (MEA probe)	day 3 -9
Step E	Assay	day 9 -14

製品に含まれない必要試薬（別売）

名称	Catalog number	注意事項
ReproCardio Assay Medium ™	ReproCELL, RCESD007	4°C 保管
Fibronectin Human, Plasma	Life Technologies, 33016-015	4°C 保管

注 1）解凍播種のマニュアルをご参照下さい（page 2-3）。

Step A: 解凍と細胞懸濁液の準備（day 0）

1. RCESD009 ： １つのバイアルの細胞懸濁液（1.0×10^5 cells/mL）へ、1.0 mL の培地を入れてください（細胞濃度は 0.5×10^5 cell/mL となります）。

   注 2） 細胞懸濁液は使用前まで細胞懸濁液の温度を下げないように、恒温槽（37°C）で温めておいて下さい。温度が下がると、生存率が低下する可能性があります。

Step B: 心筋塊の形成（U-bottom 96-well Plate）(day 0-3)

1. 300 µL の細胞懸濁液を 付属の U-bottom 96-well plate へ播種して下さい。

   注 3） 薄層心筋を形成するためには、予め心筋塊の細胞数は 1.5×10^4 cells／300 µL であることをお奨め致します。
2. 播種した細胞は 37°C、5% CO_2 インキュベーターで培養をして下さい。翌日、培地を 100 µL 除去して下さい（培地量が 200 µL となります）。
3. day 2 では 100 µL の培地を除き、新しい培地を 100 µL 加えてください。
4. 細胞は day 1-3 で凝集塊を形成します。
   心筋塊の形成率の例：(day 1) 30-50%、(day 2) 80%、(day 3) 100%

Step C: 心筋塊の播種（MEA probe）(day 3)

注 4） ほぼ全ての well で心筋塊が形成される day 3 に MEA probe へ移し替えてください。day 3 を過ぎた場合、細胞塊の内部接着が強くなるため細胞塊がくずれず、薄層化しない可能性が高くなります。

注 5) 心筋塊はプラスチック素材のプレート上では高確率で薄層化（約 90%の確率）しますが、ガラス素材のプレートでは確率が下がります（約 50%の確率）ので、複数個の MEA probe へ心筋塊を播種して下さい。

1. MEA probe を用意して下さい。
2. 5 mg Fibronectin Human, Plasma を 50 μg/mL になるように PBS（-）で希釈して下さい。
3. MEA probe1 穴に **20 μL** の 50 μg/mL Fibronectin を電極上に入れて、蒸発を避けるために probe の 4 隅に PBS（-）を各 2 mL 入れて、37°C、 5% CO_2 インキュベーター内で 1 時間以上置いて下さい。
4. PBS (-) を各 1 mL 入れてから、MEA probe 上のコーティング剤（Fibronectin 溶液）と共に取り除いて下さい。
5. P-200 ピペットを **50 μL** にセットして下さい。
6. ピペットを使用して、U-bottom plate の心筋塊および培地の 50μL を MEA probe へ移し替えて下さい。
7. 顕微鏡下でチップ、ガラス棒を使用して心筋塊を電極上に載せてください。
8. 心筋塊を播種した MEA probe は 37°C、5% CO_2 インキュベーターで培養して下さい。

Step D: 薄層心筋の形成（MEA probe）(day 4-9)

1. day 4 で培地を 200 μL 添加してください。
2. 心筋塊は拍動し始めて、徐々にくずれながら電極上に拡がっていきます。

   注 6) 培養経過と共に心筋塊の輪郭が不明瞭になって、代表的な薄層心筋画像（MEA probe）のように層の状態になることが理想的な薄層心筋です。

3. 培地交換は 1 日おきに行って下さい。P-1000 ピペットを 1,000 μL に設定して、培地をゆっくりと全て取り除き、1,000 μL の培地をゆっくりと添加して下さい。

注 7) 培地交換時に細胞が剥がれてしまうことがあるので、アスピレーターを使用せず、ピペットでゆっくりと行って下さい。

注 8) 培地を添加する時に細胞の上に直接添加しないように、壁沿いにチップの先をあてながらゆっくりと添加して下さい。

Step E: 細胞外電位測定（day 9-14)

1. 試験試薬（×10）を用意して下さい。
2. 電極内の培地温度が 37℃となるように温度調節器を設定して下さい。

注 9) 電極内の細胞周辺部が常時 **37°C** となるように適切な温度になっているか必ず確認しながら温度調節器を調節して下さい。

3. 電極内の培地を P-1000 ピペットで全て取り除いて下さい。 温められた ReproCardio Assay Medium™を 1,000 μL 添加して下さい。インキュベーター内で 10 分置いてください。
4. 実際の測定環境下が拍動を安定化するために MEA probe を測定器にセットして 10 分間測定静置して下さい。

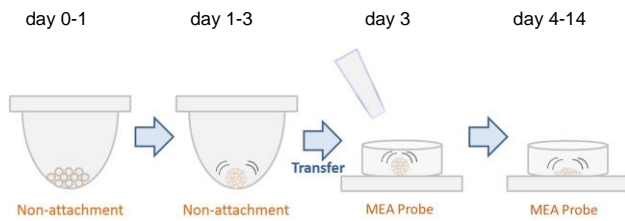
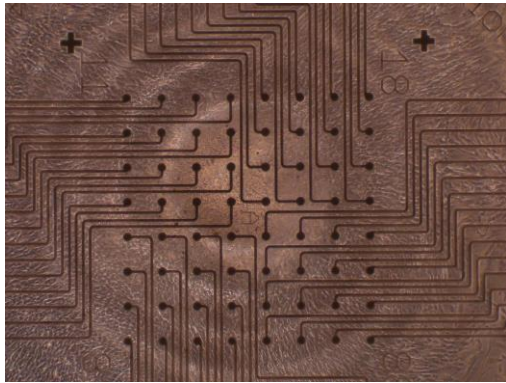
注 10) 培地交換時に細胞が剥がれてしまうことがあるので、アスピレーターを使用せず、ピペットでゆっくりと行って下さい。

注 11) 細胞外電位測定は day 9-14 の間に行って下さい。day 9 以前では拍動が安定化しない可能性があり、一方 day 14 以降では細胞が剥がれてくる可能性が高くなります。

5. 細胞外電位を測定して、拍動心筋細胞の品質(拍動回数、拍動間隔)を確認してください。
6. 試薬の添加は、試験試薬（×10）の量分を抜いてから試験試薬を添加して下さい。
7. 細胞の刺激とならないように細胞周辺部をゆっくりとピペッティングして、試験試薬を混ぜて下さい。
8. 添加後 4 分あるいは 10 分間の細胞外電位の波形を記録して最後の 2 分間の波形を解析して下さい。

注 12) 用量依存性を確認する場合、6-8 の段階を繰り返して下さい。

心筋塊形成から薄層心筋へ再形成の概略図

1．心筋塊形成の模式図

2．代表的な薄層心筋画像（MEA　probe）

よくある質問

Q1．U 字プレート内の心筋塊が拍動しません。

A1．通常 day 2-3 で拍動を開始しますが、day 4 以降になる場合も観察されておりますので培地交換と観察を継続して下さい。電極上に移す場合は拍動していなくても塊の状態になっていたら移して下さい。

Q2．培地交換はどの程度の頻度でした方が良いですか

A2.一日おきに行って下さい。培地は予め複数個に分注してご使用下さい。

Q3．MEA probe に移しても薄層化しません。

A3．day 3 で移し替えても薄層化しないことは、約 50%の確率となっております(現在、開発中となっております)。現段階では複数個の MEA probe へ心筋塊を播種することをお奨め致します。

Q4．薄層心筋が MEA probe から剥がれました。

A4．培地交換時、長期間の培養（day 14 以上）で剥がれることがございますので、アッセイに使用する場合は day 9-14 の間でご使用いただくようお願い致します。

Q5．細胞外電位のデータが取得できません。

A5．薄層心筋の拍動領域が電極上にあると、細胞外電位が取得できますが、電極から拍動領域が離れた場合には電位が取得できませんので、複数個の MEA probe へ心筋塊を播種することをお奨め致します。

Q6．細胞外電位のデータが安定化しません。

A6．通常 day 10 以降で安定した拍動が観察されますが、もし安定した拍動が得られない場合は、培養期間の延長、試験環境下の温度調節にもご注意下さい。

ReproCardio2™：カルシウムイメージング

実験操作の重要ポイント

1. 心筋塊をアッセイプレートへ移す時に、well の中央になるように注意して下さい。
2. 安定した拍動状態でアッセイをするためには、解凍後７日の培養を必要とします。
3. 蛍光インジケータ （Cal-520） は解凍後、再凍結を繰り返さないことをお奨め致します。

実験スケジュール　（薄層心筋の形成）

		day 0	day 3	day 9	day 14
Step A	Thawing	day 0			
Step B	Cell clump formation (U-bottom)	day 0 - 3			
Step C	Transfer		day 3		
Step D	Cell clump attachment (V-bottom*)		day 3 -9		
Step E	Assay			day 9 -14	

別途ご準備いただく必要試薬（別売）

名称	品番	保存
ReproCardio Assay Medium™ (100mL)	ReproCELL RCESD007	4℃
Cal-520™AM	ABD Bioquest 21130	20℃
Cremophor EL	Sigma C5135-500G	室温
V 底 96-well plate	Sumitomo bakelite MS-9096V	室温
DMSO	WAKO 049-07213	室温

注 1）解凍播種のマニュアルをご参照下さい（page 2-3)。

Step A: 解凍と細胞懸濁液の準備 （day 0）

1. RCESD009 ： １つのバイアルの細胞懸濁液（1.0×10^5 cells/mL）へ、1.0 mL の培地を入れてください（細胞濃度は 0.5×10^5 cell/mL となります）。

注 2) 細胞懸濁液は使用前まで細胞懸濁液の温度を下げないように、恒温槽（37°C）で温めておいて下さい。温度が下がると、生存率が低下する可能性があります。

Step B: 心筋塊形成（非接着性 U-bottom 96-well plate）（day 0-3）

1. 200 µL の細胞懸濁液を 付属の非接着性 U-bottom 96-well plate へ播種して下さい。

注３） 薄層心筋を形成するためには、予め心筋塊の細胞数は 1.0×10^4 cells／200 µL であることをお奨め致します。

2. 播種した細胞は 37℃、5% CO_2 インキュベーターで培養をして下さい。
3. day 2 では 100 µL の培地を除き、新しい培地を 100 µL 加えてください。
4. 細胞は day 1-3 で凝集塊を形成します。
   心筋塊の形成率の例：(day 1) 30-50%、(day 2) 80%、(day 3) 100%

Step C: 心筋塊の播種（day 3）

1. 別売りの接着用 96-well plate（V 底）を用意して下さい。
2. ReproCoat を 50 µL/well 添加して、少なくとも 12 時間以上インキュベーター内で静置してコーティングして下さい。
3. アスピレーターで ReproCoat を全て取り除いて下さい。
4. P-200 ピペットを **200 µL** に設定して下さい。
5. 培養中の心筋塊を、培地ごとピペットで吸って、96 well plate（V 底）へ移して下さい。day 3 の心筋塊は細胞間結合が弱いので、心筋塊を吸う時にピペットで 3 秒数えながらゆっくりと行って下さい。

注４） 播種後、心筋塊が well の中央となるように、プレートを傾けて、調節して下さい。

6. day 9 まで培養してください。day 9 以降（day 14 まで）にアッセイにご使用下さい。

Step D: 心筋塊の接着培養後の維持　(day 3 以降)

1.　培地交換の際は、必要量の ReproCardio Culture Medium 2™ (FBS+) (以下、培地という) を分取し、37℃の恒温槽で 15 分以上加温したものを使用してください。
2. 培地交換は day 4 から 1 日おきに行って下さい。培地は 100 μL/well 取り除いてから、新しい培地を 100 μL/well 添加して半量交換して下さい。

   注５） 新しい培地を添加する時に細胞に直接かからないように、チップの先を壁沿いにあてながら添加して下さい。
3. 37℃、5% CO_2 インキュベーター内で培養して下さい。

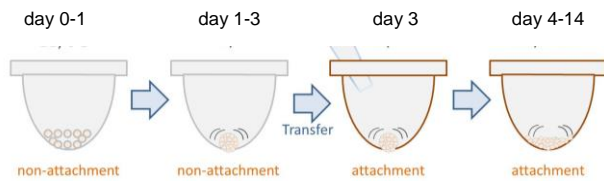
Step E: カルシウムイメージング（day 9-14）

1. アッセイに必要な量 （例えば、96 well 分で総量 20 mL）の ReproCardio Assay Medium ™を分取し、最終濃度が Cal-520™AM/DMSO が 5 μM、Cremophor EL/DMSO が 0.05%となるよう 2 種の試薬を混合して DMSO で希釈します。（以下、カルシウム指示薬混合液という）。余ったカルシウム指示薬混合液は冷凍庫で凍結保存が可能ですので、分注後に-20℃凍結保存をお奨め致します。
2. 培地を 100 μL 取り除いてください。
3. Step E の 1 で調製したカルシウム指示薬混合液を Vortex で 10 秒混合して 100 μL/well 添加して下さい。
4. 37℃、5% CO_2 インキュベーター内で 120 分間培養して下さい。
5. 試験用の薬剤 (×10) を用意し、希釈後 37℃に加温して下さい。
6. プレートをインキュベーターから取り出して、カルシウム指示薬を含む培地を 180 μL 取り除いて下さい。
7. ReproCardio Assay Medium ™を 80 μL/well 添加して下さい。
8. アッセイをする環境下で 10 分間おいて下さい。
9. 試験用の薬剤を添加前に、蛍光検出と拍動状態を確認するために検出波長（Ex 490 nm/Em 514）の蛍光画像を 30 秒間 取得して下さい。

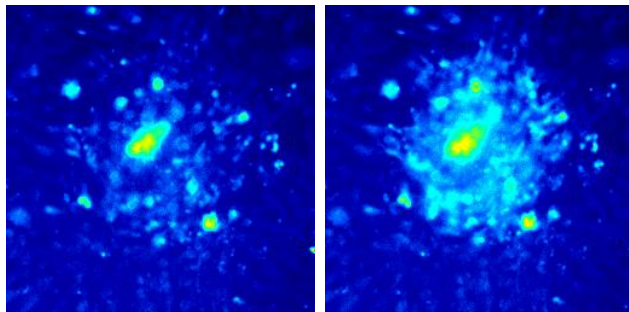
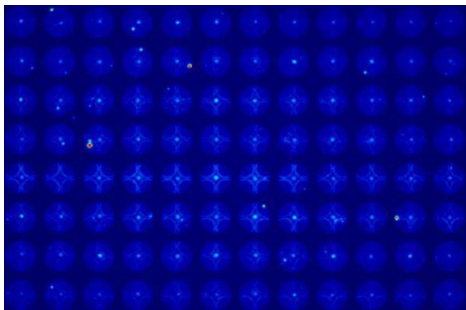
   注６） 代表的な図は倒立顕微鏡 (ECLIPSE Ti; Nikon) と FDSS/μCELL (HAMAMATSU PHOTONICS) を使用しております。
10. 試験用の薬剤の作用を確認するために、10 μL/well の ReproCardio Assay Medium ™を取り除き、試験試薬（10×）を 10 μL/well を添加して下さい。ゆっくりとピペッティングをして下さい。
11. 試験試薬添加 10 分後に、30 秒間蛍光画像を取得して下さい。
12. 用量依存性を測定する場合、10-11 の段階を繰り返して下さい。

    注７） 蛍光試薬で染色後、培地中の蛍光試薬を取り除いてから 180 分以内に画像を取得して下さい。180 分以上経過すると退色していく可能性が高くなります。
13. 取得した画像から蛍光強度は解析ソフト AQUACOSMOS (HAMAMATSU PHOTONICS) 等を使用して下さい。

心筋塊形成から薄層心筋へ再形成の概略図

1． 各ステップの模式図

注 8) day 3 以降の培養プレートは接着用 96-well plate（丸底）をご使用下さい。

2. 代表的な蛍光画像

左図：弛緩時の画像 右図：収縮時（発光）の画像

下図 FDSSμCELL を使用した画像

よくある質問

Q１ 心筋塊を移し替えた後に拍動が止まってしまいました。

A１ 移し替えた直後は、拍動がとまることがありますが、インキュベーターで１時間ほどおくと再び拍動します。

Q２ 蛍光が明滅しないのですが、どうしたらよいでしょうか？

A２ まずは拍動しているかを確認してください。もしも拍動していない場合は、培養期間を 2-3 日延長して再度実施してください。一方で拍動している場合は、カルシウム指示薬混合液の暴露下で明滅しているか確認してから、蛍光色素を抜いてください。蛍光色素暴露下でも明滅していないようでしたら、新しく蛍光色素を解凍することをお奨め致します。

Q３ 心筋塊が well の中央からずれてしまったのですが、アッセイができるでしょうか？

A３ 拍動していれば問題ありません。蛍光顕微鏡での測定においても問題ありません。ただし、FDSSμCELL のような HTS 用のフォーマットでは中央に位置した方が測定しやすいので、中央に位置していた方がよいです。

Q４ 長期間のカルシウムイメージングをする方法はありますか？

A４ 培地へ Cal-520 （2 μM）を直接添加してください。バックグラウンドが高い場合はクエンチャーを使用することをお奨め致します。

Movies of beating thin layers available:

https://www.reprocell.com/en/cardio-layer/

ReproCardio2™ ：パッチクランプ用の培養方法

実験操作の重要ポイント

1. コーティング剤の調製は必ずこのマニュアルに沿って、ReproCardio Coat for Patch Clamp Solution B™とC™を混合後、添加まで 15 分以内で行って下さい。
2. 培地交換時に、接着していた心筋細胞が剥がれないように、培地の除去は、アスピレーターを使用せず、ピペットを用いて行ってゆっくり行なって下さい。また、培地の添加も well の壁伝えにゆっくりと行ってください。
3. アッセイは必ず day 7 以降 day 14 以内に行なってください。

実験スケジュール

		day 0	day 3	day 7	day 14
Step A	Coating	day 0			
Step B	Thawing	day 1			
Step C	Culture	day 2 -7			
Step D	Assay			day 7 -14	

別途ご準備いただく必要試薬

名称	品番	保存
ReproCardio Coat for Patch Clamp Solution A™ (12 mL)	ReproCELL RCESD020	4℃
ReproCardio Coat for Patch Clamp Solution B™ (0.4 mL)	ReproCELL RCESD020	−20℃
ReproCardio Coat for Patch Clamp Solution C™ (1.4 mL)	ReproCELL RCESD020	−20℃
24-well plate; flat bottom	TPP Z707791-126EA	室温
Coverslip	MATSUNAMI C013001I	室温

Step A: コーティング（day 0）

注 1） コーティング剤の Coat B と Coat C を混合してから Coverslip への添加までを 15 分以内に素早く行なってください。

1. Coverslip をオートクレーブで滅菌する。
2. Coverslip1 枚を 24 well plate の 1well に入れる。
3. ReproCardio Coat for Patch Clamp B™（以下、Coat B)と Coat C™を冷凍庫（-30℃）から出して 1 時間氷上で解凍する。
4. Coat B と Coat C を解凍した後、Coat A を冷蔵庫から取り出す。
5. 下の混合表を参考にして、Coat B と Coat C の必要量を、別途準備した 15 mL チューブへ添加してピペッティングで混合する（室温下）。

   注 2） Coat B および Coat C の残りは-20℃冷凍保管して再度使用可能です。

6. Coat A を必要量だけ 15mL チューブに入れて、Coat B および Coat C と混合する 。

well 数	総添加量（µL）	ReproCardio Coat （µL）		
		A	B	C
1	500	437.5	12.5	50
5	3,000	2,625	75.	300
10	5,000	4,375	125	500
15	7,500	6,562	187	750
24	12,000	10,500	300	1,200

7. 24 well plate の well あたり 500 µL の混合液（6 で調整済溶液）をカバーガラス上に添加する。
8. 室温下で 6 時間以上放置する。
9. 6 時間以上放置後、上清を除去して ReproCardio Culture Medium 2™を入れて 37℃、 5% CO_2 インキュベーター内で一晩保管する。

注３）解凍播種のマニュアルをご参照下さい（page 2-3)。

Step B: 細胞解凍（day 1）

1. RCESD009 ： 1 つのバイアルの細胞懸濁液（1.0×10^5 cells/mL）へ、1.0 mL の培地を入れてください（細胞濃度は 0.5×10^5 cell/mL となります）。

   注４） 培地および細胞懸濁液は使用前まで細胞懸濁液の温度を下げないように、恒温槽（37°C）で温めておいて下さい。温度が下がると、生存率が低下する可能性があります。

2. Step A で用意したコーティング済のカバーグラスの上清を除去後、各 well に 500 µL の ReproCardio Culture Medium 2™ (FBS+）添加してください。
3. 細胞懸濁液 500 µL をゆっくりと加えてください（細胞数は 2.5×10^4 cells/well となります)。
4. 37°C、 5% CO_2 インキュベーター内で培養します。

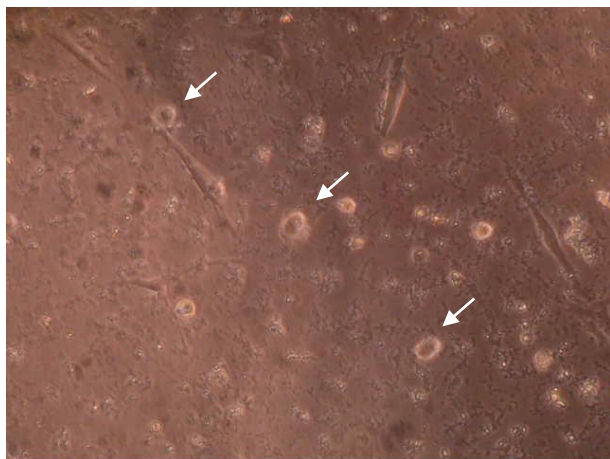
注５） 培地交換時に細胞が剥がれてしまうことがあるので、アスピレーターを使用せず、ピペットでゆっくりと行って下さい。

Step C: 細胞培養　(day 2－7)

1. ReproCardio Culture Medium 2 TM (FBS+) を用いて、day 3、day 5、day 7、（以下 1 日置き）に培地交換を行います。
2. 培地交換前に ReproCardio Culture Medium 2 TM (FBS+) を使用分だけ分注して 37℃恒温槽で 15 分間温めます。
3. P-1000 ピペットで古い培地 500 μL 取り除き、
新しい培地 500 μL を添加することで半量交換して下さい。
4. 培地交換後は 37℃、5% CO_2 インキュベーター内で培養します。

注 6) 播種後 7 日目までは心筋細胞の接着が弱いので培地交換は well の壁伝えにゆっくりと行ってください。

Step D: アッセイ（day 7－14)

パッチクランプは必ず day 7-14 の期間で実施してください。day 7 より短いとパッチがあてにくいため、十分なデータが得られない可能性が高くなります。

カバーグラス上に接着した心筋細胞（×200 倍）の例

白矢印で示したような丸い細胞はパッチクランプに適しています。

よくある質問

Q1．Web ページ上のパッチクランプのデータは、どのような方法（whole cell 法、outside-out 法）で取得したのでしょうか？

A1 Whole cell 法となります。

Q2．パッチクランプに用いる溶液はどのような組成になっているのでしょうか？

A２．以下のような組成となっております。ただし、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞のために特別に調製されたものではございません。

【内液】
140mM KCl
1mM MgCl2
5mM EGTA
10mM HEPES
5mM MgATP
KOH で pH7.2 に

【外液】
150mM NaCl
4mM KCl
1mM MgCl2
1.2mM CaCl2
10mM HEPES
10mM Glucose
NaOH で pH7.4 に

Q３．細胞がカバーガラスに接着しません。

A３　細胞を播種してからは、なるべくプレートを動かさないことをお奨め致します。

Q４．心筋細胞が拍動していませんが大丈夫ですか？

A４．心筋細胞の拍動はわかりにくく観察しにくいので、倍率 200 倍にして観察してください。通常、day 3 では拍動を開始しておりますが、実際のパッチは day 7 以降に実施してください。

Q５．拍動する細胞にパッチをあてるのでしょうか？拍動していないものでも大丈夫ですか？

A５．拍動している細胞は活動電位が起こっている細胞なので、拍動している細胞にパッチをあててください。

Q６．コーティング剤の調製に必要以上の時間を要した場合はどうなりますか？

A６．うまくコーティングできない可能性が高いので、予め必要量を計算して、Coat B と Coat C を混合後は 15 分以内にコーティングしてください。

製品の使用について

本品は研究用ですので、治療・診断目的には使用しないで下さい。
また本品を当社からの許可なしに、第三者への販売や商業目的に使用することを禁じます。

ReproCELL Inc.
Website: https://www.reprocell.com
E-mail: info_jp@reprocell.com